

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Balai Besar Perikanan Budidaya Laut (BBPBL) Lampung yang merupakan Unit Pelaksana Teknis dari Kementerian Kelautan dan Perikanan yang salah satu tupoksinya adalah pengembangan teknologi budidaya perikanan khususnya perikanan laut, dan Ikan Kakap Putih (*Lates calcarifer* Bloch) merupakan salah satu komoditas yang dikembangkan di balai ini.

Penelitian dilakukan di Balai Besar Perikana Budidaya laut (BBPBL) Lampung karena instansi ini memiliki fasilitas yang memadai untuk dilakukan uji coba ini, yaitu berupa:

- a. Mempunyai fasilitas laboratorium yang memadai untuk dilakukan uji coba Waktu Henti Obat
- b. Mempunyai fasilitas pendukung untuk pengolahan limbah hasil pengujian
- c. Mempunyai fasilitas keselamatan kerja personil yang sesuai setandar

Penelitian dilakukan selama 3 bulan yang meliputi persiapan penelitian berupa aklimatisasi ikan uji, perlakuan penelitian dan analisis laboratorium.

#### **3.2. Metode**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan skala laboratorium. Menurut Sugiono (2011) metode eksperimen adalah metode penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap yang lain dalam kondisi yang terkendalikan, pada penelitian ini yaitu dengan melakukan

usaha mencari pengaruh dari variabel tertentu terhadap variabel lain yang dibandingkan dengan ikan kontrol yang tidak diberikan perlakuan. Dalam eksperimen ini bertujuan untuk menyelidiki akan adanya hubungan keterkaitan antar variabel pada sekelompok ikan yang diberikan perlakuan yang dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberikan perlakuan.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan secara acak dengan tes dan kelompok kontrol (*The Randomized Posttest Only Control Group Design*) yaitu ada dua kelompok dalam rancangan ini yaitu 1 kelompok tidak mendapat perlakuan (kelompok kontrol) dan kelompok ikan yang mendapat perlakuan.

R	X	O1
R		O2

Keterangan :

R = Kelompok rambang

X = *Treatment* yang diberikan

O1 = Nilai tes akhir kelompok yang diberikan perlakuan

O2 = Nilai tes akhir kelompok yang tidak diberikan perlakuan

Variabel dependen yang diamati pada penelitian ini adalah nilai konsentrasi residu dari antibiotik Oksitetrasiklin baik yang berada di dalam daging Ikan Kakap Putih (*L. calcarifer* Bloch) maupun yang terdapat pada feses dan sisa pakan terbuang serta yang ada di air media pemeliharaan. Sedang variabel independennya adalah waktu atau lamanya nilai residu tersebut berkurang.

Ujicoba menggunakan bak beton sebanyak 3 bak dengan ukuran masing-masing 1,5 m x 1,5 m x 1,5 m, supply air dari ke-3 bak berasal dari sumber yang sama dengan dasar mengerucut ditengah dengan lubang outlet di tengahnya yang fungsinya supaya kotoran dapat terkumpul di tengah bak sehingga memudahkan dalam membersihkan. Volume air laut dari tiap bak sebesar 1500 – 2250 cm<sup>3</sup> dan tiap bak diberikan aerasi sebanyak 2 buah. Detail layout bak uji adalah sebagai berikut :



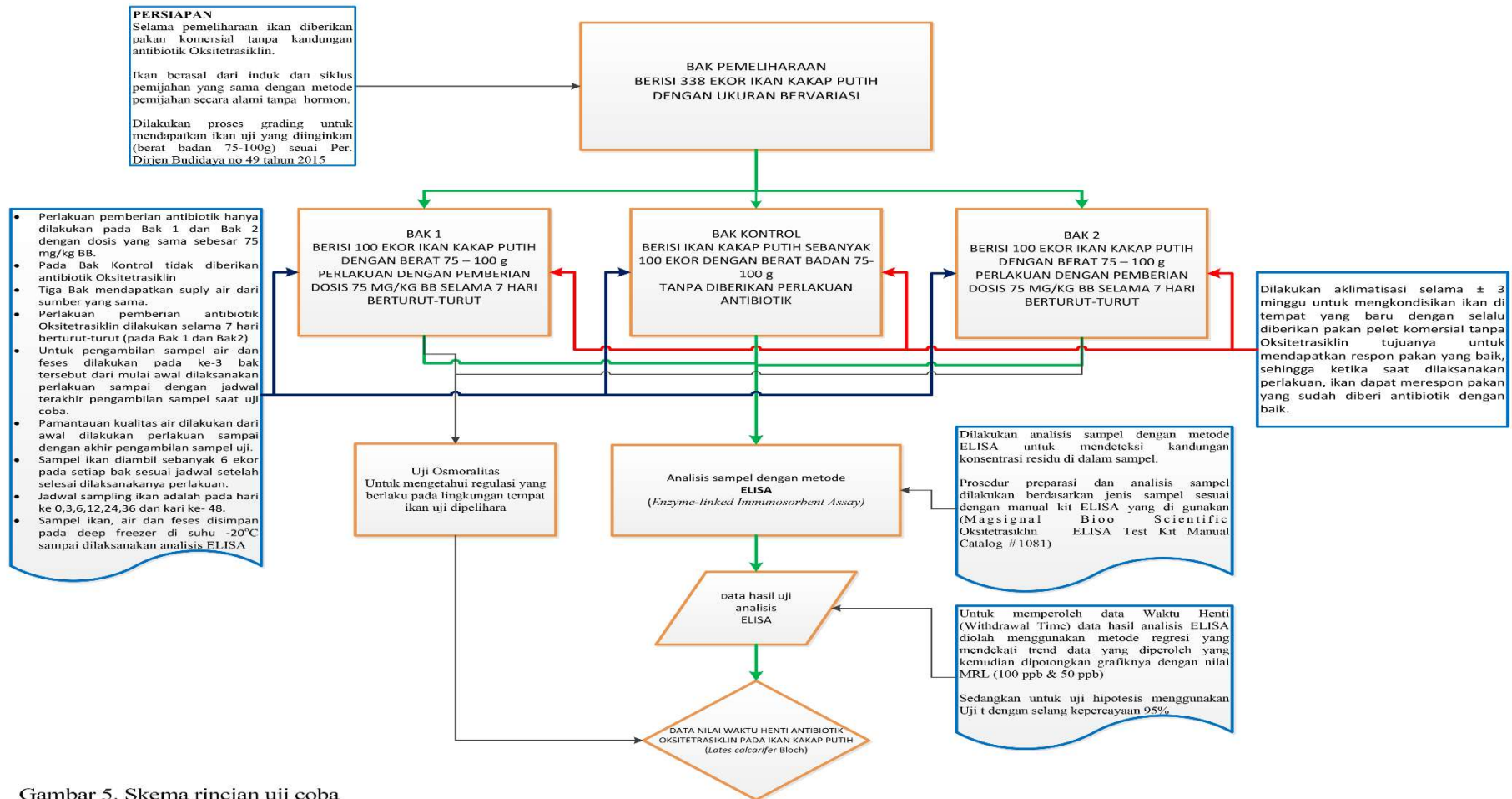
Gambar 4. Tata Letak Bak Uji Coba

### 3.2.1. Variabel yang Diamati

Variabel yang menjadi pengamatan utama adalah:

- a. Nilai konsentrasi residu antibiotik pada daging ikan pada ikan yang diberikan perlakuan
- b. Nilai Biokonsentrasi Faktor (BCF) menghitung daya serap dan distribusi residu antibiotik, yaitu dengan melihat konsentrasi dalam jaringan tubuh organisme yang di bandingkan dengan konsentrasi antibiotik yang diberikan..
- c. Nilai konsentrasi residu antibiotik yang terpapar ke lingkungan yaitu melalui feses dan sisa pakan yang terbuang serta konsentrasi di air pemeliharaan.
- d. Nilai konsentrasi residu antibiotik dalam pakan yang sudah diberi obat antibiotik yang akan diberikan pada ikan sebagai data acuan awal besarnya antibiotik yang diberikan.
- e. Kondisi kualitas air selama penelitian yang merupakan gambaran kondisi lingkungan semi terkontrol dalam penelitian ini.

Berikut alur pelaksanaan uji coba yang dilakukan:



Gambar 5. Skema rincian uji coba

### 3.2.2. Prosedur Pelaksanaan

Prosedur pelaksanaan mengacu pada Prosedur Pengujian Waktu Henti Obat Ikan (Maskur *et al.*, 2012) sebagai berikut:

#### 3.2.2.1. Ikan Uji

Ikan yang digunakan adalah ikan Kakap Putih (*L. calcarifer* Bloch.) dengan berat badan kisaran 75 – 100 g/ekor dengan asumsi bahwa dengan berat badan tersebut ikan sudah memiliki cukup daging yang dapat dianalisis kadar residunya. Jumlah ikan dalam uji coba ini adalah 300 ekor ikan dengan dibagi dalam 3 bak pemeliharaan, Ikan diaklimatisasi di dalam 3 bak beton dengan volume air 1000 - 2000 m<sup>3</sup> dengan populasi masing-masing 100 ekor selama kurang lebih 2 minggu – 1 bulan, tujuan aklimatisasi adalah supaya ikan dapat menyesuaikan diri pada tempat uji sehingga respon terhadap perlakuan akan lebih baik. Alasan pemilihan ikan Kakap Putih selain secara ekonomis sebagai komoditas unggulan, juga karena ikan ini mempunyai perilaku yang cukup agresif terhadap pakan yang diberikan, harapanya dengan perilaku tersebut pakan yang diberikan dapat cepat termakan sehingga mengurangi waktu pakan mengapung dalam air sehingga potensi larutnya antibiotik dalam air dapat diminimalisir.

Selama aklimatisasi ikan diberikan pakan pellet yang biasa digunakan dari awal pemeliharaan sehingga respon ikan terhadap pakan tetap sama, pakan pellet tersebut juga yang nantinya akan dicampur dengan obat antibiotik sebagai perlakuan. Pemberian pakan dilakukan sebanyak 2 kali sehari pada jam 9.00 pagi dan pada 16.00 sore dengan dosis pakan 3% berat badan ikan.

#### 3.2.2.2. Kualitas Air

Selama uji coba dari mulai hari pertama pemberian perlakuan pada ikan yaitu hari ke-1 sampai hari ke- 7 pemberian obat, kemudian pada hari pengambilan sampel ikan yaitu pada hari ke- 0, 3, 6, 12, 24, 36 dan

pada hari ke- 48 dilakukan monitoring kualitas air berupa salinitas, pH, Suhu, DO dan konsentrasi ammonia. Proses monitoring dalam hal ini pengambilan sampel air dan pengukuran dilakukan oleh petugas laboratorium kualitas air Balai Besar Perikanan Budidaya Laut (BBPBL).

### **3.2.2.3. Perlakuan**

Dalam kegiatan ini terdapat 1 perlakuan 1 ulangan perlakuan dan 1 kontrol (tanpa perlakuan) sebagai berikut:

#### **1. Kontrol**

- Ikan uji yang masuk kelompok kontrol tidak diberi perlakuan pemberian antibiotik Oksitetrasiklin pada pakan yang diberikan selama pemeliharaan. Jumlah ikan kontrol adalah 100 ekor.

#### **2. Perlakuan**

- Ikan uji yang masuk kelompok perlakuan diberi pakan yang mengandung Oksitetrasiklin dengan dosis 75 mg/kg bobot tubuh ikan/hari selama 7 hari berturut-turut (dosis dihitung berdasarkan zat aktif Oksitetrasiklin dalam obat). (Webby. 2013)
- Prosedur persiapan pakan yang diberikan antibiotik adalah sebagai berikut:
  1. Mempersiapkan pakan yang dikonsumsi oleh ikan uji berdasarkan dosis pemberian pakan harian yaitu 3% dari berat badan ikan. Karena berat rata-rata ikan adalah 100 g maka jumlah pakan untuk 1 bak dalam 1 hari adalah sebesar 300 g. Kemudian dari 300 g pakan ini di bagi menjadi 2 bagian yaitu 150 g untuk pagi dan 150 g untuk sore. Obat antibiotik dicampurkan pada 150 g pakan yang akan diberikan pada pagi hari, dengan harapan pada waktu pagi hari kondisi ikan dalam keadaan lapar sehingga 150 g tersebut dapat termakan seluruhnya.
  2. Proses pencampuran pakan dengan antibiotik. Dosis yang diberikan adalah 75 mg/kg berat badan. Jadi untuk 1 bak yang

berisi 100 ekor ikan uji dengan berat total 10 kg maka diperlukan sekitar 750 mg. Perhitungan 75 mg/kg BB tersebut berdasarkan jumlah bahan aktif yang ada dalam obat tersebut. Kandungan bahan aktif dalam obat antibiotik yang diberikan adalah sejumlah 40% yaitu dari setiap gram obat mengandung 40 mg bahan aktif Oksitetrasiklin. Jadi untuk dosis ikan dengan berat total 10 kg berikut adalah perhitungannya:

Dosis : 75 mg/kg BB

Berat ikan dalam 1 bak : 100 g x 100 ekor = 10.000 g (10kg)

Jumlah dosis antibiotik yang dibutuhkan untuk 1 bak dalam 1 hari adalah :

$$\Rightarrow 75 \text{ mg} \times 10 = 750 \text{ mg}$$

Kandungan bahan aktif dalam obat yaitu 40 % artinya dalam 1 g obat terdapat 40 mg bahan aktif Oksitetrasiklin. Untuk dosis 75 mg/kg BB maka obat yang ditimbang adalah :

$$\Rightarrow \text{Dosis} = \frac{0,75 \times 100}{40}$$

$$\Rightarrow 1,875 \text{ g}$$

Jadi jumlah obat yang harus di campurkan pada pakan setiap harinya adalah 1,875 g.

Selanjutnya mencampur 1,875 g obat ke dalam 150 g pakan yang sudah dipersiapkan. Proses pencampuran yaitu dengan menggunakan media perekat (binder) yang dilarutkan bersama obat kemudian di campurkan merata pada 150 g pakan, kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan pada suhu kamar.

- Teknik pemberian pakan pada ikan uji saat perlakuan.

Pemberian pakan dilakukaselama 7 hari berturut turut yaitu dengan memberikan sebanyak 150 g pakan yang sudah mengandung antibiotik pada pagi hari supaya saat diberikan pakan yang mengandung antibiotik dapat dimakan seluruhnya karena ikan dalam kondisi lapar.

#### **3.2.2.4. Prosedur Pengambilan Sampel**

Sampel yang diambil untuk analisis Oksitetrasiklin meliputi sampel pakan dan sampel ikan, sebagai berikut :

##### **1. Pakan**

- Pakan kontrol  
Pakan yang tidak dicampur antibiotik diambil 2 sampel untuk diuji kandungan Oksitetrasiklin -nya
- Pakan untuk perlakuan  
Pakan yang dicampur antibiotik diambil sampel setiap hari selama perlakuan sebanyak 3 g untuk diuji kandungan Oksitetrasiklin-nya

##### **2. Ikan**

Sampel ikan diambil sebanyak 6 ekor dari masing-masing bak pemeliharaan, yaitu bak perlakuan 6 ekor sampel, bak ulangan 6 ekor sampel dan bak kontrol 6 ekor sampel, kemudian keenam ikan dipreparasi dan dianalisis dengan ELISA. Pengambilan sampel ikan untuk semua bak:

- Diambil setelah hari terakhir perlakuan ( $t_0$ ),
- 3 hari setelah perlakuan ( $t_3$ )
- 6 hari setelah perlakuan ( $t_6$ )
- 12 hari setelah perlakuan ( $t_{12}$ )
- 24 hari setelah perlakuan ( $t_{24}$ )
- 36 hari setelah perlakuan ( $t_{36}$ )
- 48 hari setelah perlakuan ( $t_{48}$ )

##### **3. Air Pemeliharaan dan Feses Ikan**

Pengambilan sampel air dilakukan pada saat pemberian antibiotik dan pengambilan sampel feses pada 24 jam setelah pemberian antibiotik dengan



asumsi sudah terjadi proses metabolisme dari ikan dan diasumsikan bahwa sudah terjadi ekresi dari sebagian residu antibiotik oleh ikan melalui urine dan feses. Pengambilan sampel air dilakukan setiap hari pada saat perlakuan yaitu pada saat setelah selesai pemberian pakan dan setiap jadwal pengambilan sampel ikan. Sedang untuk feses diambil 24 jam setelah pemberian pakan selama 7 hari masa perlakuan dan setiap pagi yang disamakan jadwalnya dengan waktu pengambilan sampel ikan.

### **3.3. Prosedur Analisis Oksitetrasiklin**

Analisis Oksitetrasiklin pada daging ikan dan pada air sisa dan feses ikan menggunakan metode ELISA yaitu metode yang prinsip kerjanya adalah reaksi kompleks antara antibody – antigen dengan melibatkan peran enzyme konjugasi anti spesies immunoglobulin dan substrat sebagai indikator dalam reaksi, sedang pengujian mengikuti prosedur pada Magsignal Bioo Scientific Oksitetrasiklin ELISA Test Kit Manual Catalog #1081.

#### **3.3.1. Prosedur Persiapan Sampel**

##### **3.3.1.1. Persiapan Reagen**

Reagen yang dipersiapkan untuk persiapan sampel untuk proses analisis dengan metode ELISA antara lain:

1. Larutan induk standar Oksitetrasiklin disiapkan dengan cara mengencerkan bubuk standar Oksitetrasiklin yang berada dalam tabung stok sebanyak 450 ng dengan mencampur sebanyak 1,5 ml untuk mendapatkan larutan standar dengan konsentrasi 300 ppb. Homogenkan dengan pengadukan menggunakan vortex selama 2 menit dan dikondisikan pada suhu ruangan selama 10 menit, ulangi prosedur pengenceran tersebut sebanyak 3x untuk memastikan bubuk standar benar-benar larut. Kemudian dilanjutkan dengan pembuatan larutan standar yang akan digunakan pada analisa, berikut tabel langkah-langkah pengenceran larutan standar sampai siap digunakan.

Tabel 5. Langkah pembuatan larutan standard kerja

Larutan Standard Oksitetrasiklin	Larutan sumber Oksitetrasiklin	Volume dari larutan Oksitetrasiklin	Volume larutan standard
Vial 4,5 ppb	Vial Stock 300 ppb	30 $\mu$ l	1970 $\mu$ l
Vial 1,5 ppb	Vial 4,5 ppb	500 $\mu$ l	1000 $\mu$ l
Vial 0,75 ppb	Vial 1,5 ppb	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l
Vial 375 ppb	Vial 0,75 ppb	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l
Vial 0,15 ppb	Vial 375 ppb	500 $\mu$ l	750 $\mu$ l
Kontrol Negatif	-	0 $\mu$ l	500 $\mu$ l

(Oksitetrasiklin ELISA Test Kit Manual Catalog 1081)

2. Larutan pencuci, untuk mendapatkan 1 X larutan pencuci yaitu dengan cara mengencerkan 20 X Larutan pencuci dengan 19 volume Aqua Bidestilata
3. Larutan 1X HRP-Conjugat Antibody#2, untuk mendapatkan larutan 1 X HRP – Conjugat Antibody #2 harus mengencerkan larutan induk 100X HRP-Conjugat Antibody #2 dengan 99 volume Pelarut Antibody #2.
4. Larutans stok n-hexane sebanyak 500 ml

### 3.3.1.2. Prosedur Preparasi Analisis ELISA pada Daging Ikan

Berikut adalah proses preparasi untuk analisis deteksi residu Oksitetrasiklin pada daging ikan :

1. Sampel daging ikan diambil sebanyak 1 g yang sudah dihaluskan kemudian ditambahkan 1X larutan buffer ekstraksi dan 1 ml n-hexane.
2. Sampel daging ikan dihomogenka dengan cara divortex selama 10 menit.
3. Sampel cair dipisahkan dengan sampel padat dengan cara mencentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 4000 x g.
4. Larutan n-hexane pada bagian atas dibuang.
5. Sampel cair sebanyak 200 $\mu$ l dipindahkan pada tabung baru kemudian ditambahkan dengan 25  $\mu$ l Buffer penyeimbang kemudian tambahkan juga 275  $\mu$ l TET pelarut sampel.
6. Sampel dihomogenkan lagi dengan cara divortex selama 1 menit.

7. Dari sampel tersebut diambil sebanyak 75  $\mu$ l dan diletakan pada plate untuk dibaca di ELISA reader.
8. Faktor pengencer adalah 10

#### **3.3.1.3. Prosedur Preparasi Analisis ELISA untuk Sampel Pakan**

1. Diambil sebanyak 1 g sampel dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 4 ml 1X buffer ekstraksi khusus pakan.
2. Sampel dihomogenka dengan cara divortex selama 15 menit
3. Sampel cair dipisahkan dengan sampel padat dengan cara mencentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 4000 x g.
4. Diambil sebanyak 25  $\mu$ l larutan sampel kemudian dimasukan ke dalam tabung reaksi yang sudah terdapat 975  $\mu$ l larutan pengencer.
5. Sampel dihomogenkan lagi dengan cara divortex selama 1 menit.
6. Dari sampel tersebut diambil sebanyak 75  $\mu$ l dan diletakan pada plate untuk dibaca di ELISA reader.
7. Faktor pengenceran :160

#### **3.3.1.4. Prosedur Preparasi Analisis ELISA untuk Sampel Air dan Feses**

1. Diambil sampel sebanyak 1 ml, kemudian ditambahkan 3ml 1X buffer ekstraksi.
2. Sampel dihomogenkan dengan menggunakan vortex selama 10 menit.
3. Sampel cair dipisahkan dengan sampel padat dengan cara mencentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 4000 x g.
4. Diambil 200  $\mu$ l supernatant pada tambung baru yang sudah ada 25  $\mu$ l 1X Buffer penyeimbang OXYTET, kemudian tambahkan 275  $\mu$ l 1 X larutan pengencer sampel TET.
5. Sampel dihomogenkan dengan vortex selama 1 menit.
6. Sampel diambil sebanyak 75  $\mu$ l kemudian diletakan pada plate untuk dibaca di ELISA reader.
7. Faktor pengencer: 10

### 3.3.2. Prosedur ELISA Test

Prosedur yang dilakukan saat memulai analisa sampel yang sudah dipreparasi pada mesin ELISA adalah sebagai berikut :

1. Standard Oksitetrasiklin dimasukkan ke dalam plate dengan urutan sebagai berikut, standard (Kontrol negatif, 0,15 ppb, 0,375 ppb, 0,75 ppb, 1,5 ppb, 4,5 ppb) secara duplo.
2. Sampel yang akan dianalisa dimasukkan sebanyak 75  $\mu$ l
3. Ditambahkan 100  $\mu$ l larutan Antibody #1 pada larutan standard dan sampel yang sudah dimasukkan kemudian dihomogenkan dengan cara menggoyangkan plate selama 1 menit.
4. Diinkubasi selama 55 menit pada temperature ruangan (20-25°C).
5. Setelah inkubasi selama 55 menit kemudian dicuci dengan menggunakan larutan pencuci yaitu dengan memasukan larutan pencuci sebanyak 250  $\mu$ l pada masing-masing sampel dan standard, kemudian buang larutan pencuci dan kemudian ketuk-ketukan plate berisi sampel secara terbalik pada tisu lembut agar semua larutan pencuci dapat terbang, ulangi langkah tersebut sebanyak 3 kali.
6. Setelah dicuci kemudian dimasukkan sebanyak 150  $\mu$ l larutan 1X Antibody #2 pada tiap sampel dan standard, kemudian diinkubasi kembali pada suhu ruangan selama 25 menit.
7. Setelah 25 menit dicuci kembali mengulangi langkah pada nomor 5, yaitu mencuci dengan menggunakan larutan pencuci sebanyak 250  $\mu$ l pada masing-masing sampel dan standard.
8. Ditambahkan larutan TMB Substrat pada tiap perlakuan dan standard dan diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu ruangan.
9. Setelah inkubasi ditambahkan 100  $\mu$ l buffer penghenti supaya reaksi enzim berhenti, homogenkan dengan cara menggoyang secara perlahan plat yang berisi sampel dan standard.
10. Plate sampel dan standard dimasukkan pada mesin ELISA Reader dengan menseting panjang gelombang sebesar 450 nm, dan mulai pembacaan pada

mesin ELISA.

11. Hasil pembacaan absorbansi sampel uji dari mesin ELISA reader kemudian dianalisis pada software analisis Ridawin versi 1.65 serial no. 11988.165.

### 3.4. Prosedur Analisis Data Penentuan Waktu Henti Antibiotik

Analisis data menggunakan persamaan *trendline* power pada nilai *upper limit* dengan tingkat kepercayaan 95 %. (Perdirjen. Djpb. 2015)

Proses penentuan *upper limit* adalah dengan cara sebagai berikut:

1. Data dikelompokkan sesuai perlakuan dan waktu pengambilan sampel
2. Ditentukan nilai rata-rata, standard deviasi dan CV dari data yang diperoleh.
3. Data nilai *upper limit* ditentukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Upper limit} = \text{rata-rata} + (1,645 \times \text{Standar deviasi})$$

Keterangan : 1,645 merupakan nilai Z pada tingkat kepercayaan 95 % (dari tabel Z) Waktu Henti Obat ditentukan berdasarkan waktu terlama residu Oksitetrasiklin mencapai baku mutu (MRL) yaitu sebesar 100 µg/kg.

4. Data rata-rata dan data *upper limit* yang didapat kemudian ditampilkan dalam sebuah grafik.
5. Dari grafik tersebut dicari nilai *trendline* yang sesuai dengan pola grafik yang didapat, dalam penelitian ini yang dapat mewakili pola grafiknya adalah pola *trendline power* dengan nilai  $R^2$  paling besar.
6. Dari *trendline power* tersebut didapatkan persamaan yang digunakan untuk menghitung Waktu Henti Obat.

### 3.5. Pengukuran Osmolaritas dan Tingkat Kerja Osmotik (TKO)

Ikan selalu melakukan proses osmoregulasi untuk menjaga keseimbangan cairan tubuhnya dengan media tempatnya hidup, proses osmoregulasi ini terkait erat dengan besarnya Tingkat Kinerja Osmotik(TKO) yang tentunya memerlukan

energy tertentu dalam melakukannya. Pada kondisi hipoosmotik dan hiperosmotik, tingkat kerja osmotik yang semakin besar akan menyebabkan besarnya energi yang digunakan untuk osmoregulasi. Holliday,(1969)

Tingkat Kinerja Osmotik (TKO) dihitung berdasarkan perbedaan antara osmolaritas media dengan osmolaritas cairan tubuh ikan, Anggoro dan Nakamura, (1996)

$$\text{TKO} = [\text{P osmo darah} - \text{P osmo media}]$$

Keterangan :

TKO	: Tingkat Kerja Osmotik, mOsm/l H <sub>2</sub> O
P osmo darah	: Tekanan osmotik darah, mOsm/l H <sub>2</sub> O
P osmo media	: Tekanan osmotik media pemeliharaan, mOsm/l H <sub>2</sub> O
[ ]	: Nilai mutlak

### **3.5.1. Prosedur Pengambilan Sampel Uji Osmolaritas**

#### **3.5.1.1. Prosedur Pengambilan Sampel Air**

1. Sampel air media diambil sebanyak 1 ml dengan menggunakan spuit
2. Sampel air disimpan dalam microtube 1,5 ml dan disimpan dalam *coolbox* yang bersuhu rendah
3. Apabila analisis tidak segera dilakukan simpan sampel dalam lemari es pada suhu rendah.

#### **3.5.1.2. Prosedur Pengambilan Sampel Darah Ikan**

1. Siapkan spuit ukuran 1 ml kemudian masukan larutan EDTA secukupnya.
2. Ambil 1 ekor ikan diletakan pada kain basah atau tisu basah dengan posisi mata ditutup dengan kain atau tisu basah.
3. Dengan menggunakan jarum spuit tusuk bagian linea lateralis di belakang sirip anal dengan posisi jarum 45 ° setelah dirasa sudah mengena di bagian pembuluh utama hisap perlahan sebanyak 1 ml.
4. Darah yang sudah terhisap kemudian disimpan ke dalam microtube volume 1,5 ml yang sudah deiberikan larutan EDTA

secukupnya, kemudain di simpan untuk siap dianalisis. Apabila akan dianalisis agak lama sampel darah bisa disimpan di lemari pendingin dengan suhu kisaran 3-4 °C.

### **3.5.2. Spesifikasi dan Prosedur Penggunaan Alat Osmometer**

Alat untuk mengukur osmolaritas adalah dengan menggunakan alat osmometer type OSMOMAT 030 dari GONOTEC (Lampiran 3) dengan prosedur kerja sebagai berikut:

1. Nyalakan sumber power dari alat yang berada di bagian belakang
2. Posisikan handle sampel berada di atas
3. Alat akan melakukan prosedur pemanasan dengan indikasi lampu 'SPONT CRYST', 'RESULT' dan 'NO CRYST' menyala bergantian, tunggu sampai mati, hanya lampu "SAMPEL" yang menyala
4. ZERO SET:
  - a. Siapkan aquadest kemudian sampel dimasukan dalam tabung sampel sebanyak 50 µl, kemudian dimasukan ke sensor
  - b. Tekan tombol "ZERO" sampai keluar angka 0,000
  - c. Handle sampel diturunkan, kemudian tunggu sampai display 0,000 dan lampu RESULT menyala.
  - d. Angkat Handle
  - e. Sensor dibilas menggunakan aquadest, dan dibersihkan dengan tissue.
5. KALIBRASI
  - a. Cairan standar kalibrasi disiapkan dan masukan sebanyak 50 µl dalam tabung sampel dan masukan sensor
  - b. Tombol "CAL" ditekan sampai keluar angka 0,300
  - c. Handel sampel diturunkan dan ditunggu sampai display 0,300 dan lampu result menyala
  - d. Handel diangkat
  - e. Bilas sensor dengan aquadest dan bersihkan dengan tissue
6. SAMPEL
  - a. Cairan sampel diambil sebanyak 50 µl ke dalam tabung sampel

- dan dimasukkan ke sensor.
- b. Tombol sampel ditekan
  - c. Handel sampel diturunkan dan tunggu sampai pengukuran selesai dan lampu result menyala
  - d. Handel diangkat
  - e. Sensor dibilas dengan aquadest dan dilap dengan tissue
7. Setelah selesai sensor dibersihkan dengan aquadest, pada saat tidak dipergunakan sensor harus ditutup dengan tabung kosong dengan handel dalam posisi turun.
  8. Matikan power
  9. Cabut aliran listrik dari pusat listrik.

### 3.6. Analisis Biokonsentrasi Faktor (BCF)

Biokonsentrasi faktor digunakan untuk mengetahui kemampuan penyerapan dan laju distribusi residu di dalam tubuh organisme yang diamati, yaitu dengan melihat besarnya konsentrasi residu dalam jaringan tubuh organisme.

$$BCF = \frac{Cb}{Cw}$$

Keterangan:

$BCF$  : Faktor Biokonsentrasi

$Cb$  : Konsentrasi di dalam biota

$Cw$  : Konsentrasi di dalam air/sedimen